



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS
ALIMENTOS

EVA TEREZINHA DOS SANTOS OTA

DETECÇÃO DE *Brucella abortus* EM PRODUTOS LÁCTEOS
PRODUZIDOS EM SANTA CATARINA PELA TÉCNICA DE
REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL

FLORIANÓPOLIS, 2013.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS
ALIMENTOS

EVA TEREZINHA DOS SANTOS OTA

DETECÇÃO DE *Brucella abortus* EM PRODUTOS LÁCTEOS
PRODUZIDOS EM SANTA CATARINA PELA TÉCNICA DE
REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciência dos Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. César Damian

Florianópolis, 2013.

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Ota, Eva Terezinha dos Santos

Detecção de *Brucella abortus* em produtos lácteos produzidos em Santa Catarina pela técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real / Eva Terezinha dos Santos Ota ; orientador, César Damian - Florianópolis, SC, 2013. 67 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos.

Inclui referências

1. Ciência dos Alimentos. 2. Zoonoses . 3. Brucelose. I. Damian, César . II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos. III. Título.

EVA TEREZINHA DOS SANTOS OTA

**DETECÇÃO DE *Brucella abortus* EM PRODUTOS LÁCTEOS
PRODUZIDOS EM SANTA CATARINA PELA TÉCNICA DE
REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL**

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Ciências dos alimentos, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos.

Florianópolis, 30 de outubro de 2013.

Prof. Dra. Roseane Fett
(Coordenadora do Curso)

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. César Damian
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dra. Cleide Rosana Werneck Vieira
Membro
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Milton Luiz Pinho Espírito Santo
Membro
Universidade Federal de Santa Maria

Dr. Heitor Daguer
Membro
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

AGRADECIMENTOS

Ao ser superior que me concedeu saúde, força e determinação para mais esta jornada;

Ao meu marido Rui e ao meu filho Daniel por estarem presentes em minha vida;

Ao meu amigo Abrahan pelas palavras de otimismo e sabedoria;

Ao professor Dr. Cesar Damian pelo tempo e dedicação dispensados a mim como orientador;

À professora Dra. Cleide Rosana Werneck Vieira pelo estímulo e apoio a minha pesquisa;

Aos técnicos do Laboratório Nacional Agropecuário de Pedro Leopoldo em Minas Gerais, especialmente ao Antônio Augusto Fonseca Júnior, pela colaboração na realização das análises;

Aos meus amigos e colegas de trabalho Fábio Indá, Helena Hoffmann e Leticia Teixeira pela amizade, incentivo e companheirismo;

À Universidade Federal de Santa Catarina por me oportunizar alcançar esse grau de educação formal;

A todos os professores do Programa de Pós Graduação Centro de Ciência dos Alimentos;

A todos aqueles que contribuíram para a realização desse trabalho

Quem me dera, ao menos uma vez,
Ter de volta todo o ouro que entreguei
A quem conseguiu me convencer
Que era prova de amizade
Se alguém levasse embora até o que eu não tinha.
Quem me dera, ao menos uma vez,
Provar que quem tem mais do que precisa ter
Quase sempre se convence que não tem o bastante
E fala demais por não ter nada a dizer.
Quem me dera, ao menos uma vez,
Que o mais simples fosse visto como o mais importante
Mas nos deram espelhos
E vimos um mundo doente.
Quem me dera, ao menos uma vez,
Entender como um só Deus ao mesmo tempo é três
E esse mesmo Deus foi morto por vocês
É só maldade então, deixar um Deus tão triste.
Quem me dera, ao menos uma vez,
Acreditar por um instante em tudo que existe
E acreditar que o mundo é perfeito
E que todas as pessoas são felizes.
Quem me dera, ao menos uma vez,
Fazer com que o mundo saiba que seu nome
Está em tudo e mesmo assim
Ninguém lhe diz ao menos obrigado.
Quem me dera, ao menos uma vez,
Como a mais bela tribo, dos mais belos índios,
Não ser atacado por ser inocente.

Renato Russo

RESUMO

OTA, EVA TEREZINHA DOS SANTOS. **Detecção de *Brucella abortus* em produtos lácteos produzidos em Santa Catarina pela técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real**. 2013. Dissertação (Mestrado em ciência dos Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis-SC.

As doenças veiculadas pelo alimento constituem um grande problema de saúde pública, especialmente para os países pobres em decorrência dos altos custos econômicos e sociais que ocasionam. A contaminação do alimento pode se dar em qualquer etapa da produção, transporte, armazenamento ou comércio, sendo muitas vezes impossível determinar em qual etapa ocorreu a contaminação. Algumas zoonoses podem ser transmitidas ao homem através da ingestão de produtos de origem animal, fonte indispensável de proteína. Brucelose é uma enfermidade infecto contagiosa de caráter zoonótico, causada por bactérias do gênero *Brucella* que está amplamente distribuída em diversos países do mundo. No Brasil a doença apresenta-se de forma endêmica no rebanho bovino, causando prejuízos econômicos e representando um risco para a saúde pública. Santa Catarina tem a menor prevalência de brucelose bovina do país e busca a erradicação para tornar o Estado livre da doença. A enfermidade pode ser veiculada ao homem através da ingestão carne, leite e derivados que não passaram por processamento térmico, além do contato direto com animais doentes. Apesar do isolamento do agente ser considerado uma prova clássica possui baixa sensibilidade, é um processo trabalhoso, demorado e de alto risco biológico. O método analítico molecular de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em Tempo Real pode tornar-se uma ferramenta de grande valia, a fim de garantir um diagnóstico seguro, rápido e preciso para ser usado em amostras de alimentos. O objetivo desse trabalho foi averiguar a qualidade dos produtos lácteos em relação à presença da *B.abortus* utilizando a PCR em tempo real. Para tal, foram coletadas 100 amostras de derivados lácteos e 6 amostras de leite cru, produzidos exclusivamente em Santa Catarina, no período de abril a setembro de 2012. As análises revelaram a presença de material genético de *B.abortus* em 2 amostras de queijo e nas 6 amostras leite. A técnica mostrou-se sensível e específica e associada à rastreabilidade, possibilitou o monitoramento da cadeia produtiva e avaliação da qualidade do leite e derivados.

A integração entre os serviços de fiscalização, inspeção, pesquisa e defesa animal são fundamentais para monitorar e assegurar a qualidade dos produtos de origem animal.

Palavras chave: Zoonoses, queijo, leite cru, patógenos.

ABSTRACT

OTA, EVA TEREZINHA DOS SANTOS. **Detection of *Brucella abortus* by real-time polymerase chain reaction in dairy products in Santa Catarina.** 2013. Dissertation (Master in Food Science). Federal University of Santa Catarina, Florianópolis-SC.

Foodborne diseases are a major public health problem, especially for poor countries due to the high economic and social costs caused by them. Food contamination can occur at any stage of production, transportation, storage, or trade. It is often impossible to determine where the contamination occurred. Some zoonoses may be transmitted to humans through the ingestion of animal products, which are indispensable sources of protein. Brucellosis is a zoonotic disease caused by bacteria of the genus *Brucella* which are widely distributed in many countries. In Brazil, the disease is endemic in cattle, causing economic losses and representing a risk to public health. Santa Catarina has the lowest prevalence of bovine brucellosis in the country and seeks the eradication in order to become the disease-free State. The disease can be conveyed to people through the ingestion of meat, milk and dairy products that have not undergone thermal processing, as well as the direct contact with sick animals. Despite the isolation of the agent being considered a classic test, it has low sensitivity. In addition, it is a laborious and time consuming process, which evolves high biohazardous. The molecular analytical method of Real-Time Polymerase Chain Reaction (PCR) may become a tool of great value in order to ensure an accurate, quick, and precise diagnosis to be used in food samples. The aim of this study was to verify the quality of milk and dairy products regarding the presence of *B.abortus* using real-time PCR. In order to do that, 106 samples of milk and dairy products produced exclusively in Santa Catarina were collected. The collection was performed in the market and industry during the period of April to September 2012. Analysis revealed the presence of genetic material from *B.abortus* in two samples of cheese and six of raw milk. The technique showed itself sensitive and specific. Furthermore, in association with traceability, it enabled the monitoring of the entire production chain and quality evaluation of milk and dairy products. The integration among the services of supervision, inspection, research, and animal defense are essential to monitor and ensure the quality of animal products.

Keywords: Zoonoses, raw milk, cheese, pathogens.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1:	Distribuição do alimento de origem animal.....	25
Figura 2:	Distribuição da brucelose animal no mundo.....	27
Figura 3:	Prevalência da brucelose no rebanho bovino no Brasil.....	30
Figura 4:	Exames sorológicos para brucelose bovina realizados em Santa Catarina.....	32
Figura 5:	Modos de Transmissão da brucelose para o homem..	33
Figura 6:	Municípios com bovinos diagnosticados com Brucelose.....	35
Figura 7:	Incidência da brucelose humana no mundo.....	39
Figura 8:	Municípios que encaminharam amostras para diagnóstico de brucelose humana.....	39

CAPÍTULO 2

Figura 1:	Municípios com foco de brucelose bovina em SC.....	55
Figura 2:	Indivíduos com sorologia reagente para Brucelose, por município de SC, de janeiro de 2008 a julho de 2011 e laticínio pesquisado.....	61

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1: Espécies de *Brucelas* identificadas.....29

Tabela 2: Dose infectante relativa para o homem.....37

Tabela 3: Resistência da *B. abortus* em diferentes produtos lácteos.....41

CAPÍTULO 2

Tabela 1: Número e tipo de produto lácteo analisado no período de abril a setembro de 2012.....57

Tabela 2: Sequência de oligonucleotídeos usada na PCR em tempo real para a detecção de *B. abortus* em produtos lácteos.....62

Tabela 3: Quantidade de amostras positivas e negativas encontradas..60

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	21
2.	CAPÍTULO 1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	23
2.1.	Qualidade dos alimentos.....	23
2.2.	Rastreabilidade.....	24
2.3.	Zoonoses veiculadas por alimentos.....	25
2.4.	Brucelose.....	26
2.4.1.	Prevalência da doença no rebanho bovino.....	29
2.4.2.	Epidemiologia.....	32
2.4.3.	Brucelose bovina.....	34
2.4.4.	Brucelose humana.....	35
2.4.5.	Transmissão da Brucelose por Alimentos.....	39
2.5.	Qualidade do Leite no Processamento de Derivados.....	41
2.6.	Aplicação da técnica de PCR em alimentos.....	44
2.7.	Referências Bibliográficas.....	46
3.	3. CAPÍTULO 2.....	53
	Detecção de <i>Brucella abortus</i> em produtos lácteos produzidos em Santa Catarina pela técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real.....	53
4.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	67

1.INTRODUÇÃO

A saúde é um direito inalienável de todo cidadão, tal como está expresso na Declaração Universal dos Direitos do Homem, promulgada em 1984 pela Organização das Nações Unidas (ONU). Mas, para que haja saúde, é fundamental que os alimentos sejam produzidos com qualidade e em quantidade suficiente para garantir a saúde de todos.

Quando o ser humano aprendeu a domesticar animais para alimento ou trabalho, apareceu a necessidade de criá-los. Para os que se destinassem a parte alimentar, que seus produtos fossem de boa qualidade para garantir a saúde humana. O convívio com os animais domésticos ou silvestres levou ao conhecimento de doenças que se transmitem deles ao homem, as zoonoses (MELLO, 2011)

A saúde humana e a animal sempre estiveram interligadas. No entanto, os processos sociais e agropecuários ocorridos nos últimos anos proporcionaram um contato ainda maior entre a população humana e os animais domésticos e silvestres. Esse contato facilitou a disseminação de agentes infecciosos e parasitários para novos hospedeiros e ambientes, implicando em emergências de interesse nacional ou internacional. As notificações de zoonoses e doenças transmitidas por vetores representaram o grupo de evento de maior ocorrência, com 40 por cento (%) das notificações, no período de março de 2006 a fevereiro de 2010, dentre os 673 eventos de relevância de saúde pública registrados no Brasil naquele período. As zoonoses são consideradas um grande problema de saúde pública, pois representam 75% das doenças infecciosas emergentes no mundo. Estudos demonstram que 60% (849/1.415) dos patógenos humanos são zoonóticos e que 80% dos patógenos animais têm múltiplos hospedeiros. A disseminação dessas doenças está diretamente relacionada com a capacidade de o agente etiológico manter-se em condições viáveis na fonte de infecção (BRASIL, 2010a).

Brucelose é uma zoonose que pode ser transmitida pelo contato direto dos humanos com animais infectados ou seus produtos. A expansão da agroindústria e urbanização, a falta de medidas higiênicas e sanitárias no setor produtivo e na manipulação dos produtos de origem animal contribui em parte para a brucelose ser um perigo para a saúde pública (WHO, 2006).

Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística-IBGE- (2010), o Brasil possui um rebanho bovino de 205.292 milhões de cabeças e continua expansão, sendo o agronegócio responsável pelo incremento da economia nacional nos últimos anos.

Sendo detentor do maior rebanho comercial de bovinos do mundo, o Brasil precisa colocar no mercado produtos de origem animal de qualidade e baixo risco sanitário para consumidores internos e externos cada vez mais exigentes (BRASIL, 2006a).

O Estado de Santa Catarina ocupa uma pequena área geográfica (1,12%) do País, sendo uma das menores unidades federativas, porém o Estado é um dos principais produtores de alimentos do Brasil destacando-se principalmente na produção de suínos e aves (SIKUSAWA, 2009).

Para a população que não mantém contato com animais a fonte em potencial de contaminação da brucelose é o leite não pasteurizado e seus derivados. A carne pode ser uma significativa fonte de infecção, especialmente em culturas onde há o hábito de consumi-la crua ou mal passada. O leite pode conter um grande número de *Brucella* spp e representa um sério perigo pelo fato de serem consumidos em grandes quantidades ou na forma concentrada em queijos, cremes e outros derivados. (WHO, 2006).

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), ao instituir o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT), reconheceu essas doenças como destacados problemas de saúde animal e de saúde pública no Brasil. São zoonoses causadoras de consideráveis prejuízos econômicos e sociais, em virtude do impacto que produzem na produtividade dos rebanhos e dos riscos que acarretam à saúde humana (BRASIL, 2006a).

Este trabalho teve como objetivo geral detectar a presença de *Brucella abortus* em produtos lácteos empregando a técnica de PCR em tempo real.

Os objetivos específicos foram aplicar a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real para detecção de *Brucella abortus* em produtos lácteos produzidos exclusivamente no Estado de Santa Catarina; identificar o laticínio produtor; submeter a PCR o leite cru proveniente de laticínio; comparar os resultados analíticos positivos com os casos de brucelose humana e bovina na região.

1. CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Qualidade dos Alimentos

Segurança alimentar e nutricional é definida como “o direito de todos ao acesso regular e permanente a alimentos com qualidade, em quantidade suficiente, sem comprometer o acesso a outras necessidades essenciais, tendo como bases práticas alimentares promotoras da saúde, que respeitem a diversidade cultural e que sejam social, econômica e ambientalmente sustentáveis” (BRASIL, 2006b).

De acordo com Almeida-Muradian e Penteado (2007) os grandes avanços e inovações tecnológicas têm proporcionado uma oferta muito grande de produtos alimentares; entretanto, se por um lado, este desenvolvimento traz muitos benefícios como aumento da produção, melhoria da conservação, diversificação, atendimento às necessidades nutricionais específicas, por outro lado, pode haver uma problemática decorrente dessa modernização, como a contaminação de alimentos.

Nas sociedades modernas, o ser humano está cada vez mais distante da produção dos alimentos que consome. Para saber como um alimento foi produzido e se é adequado para nosso consumo, dependemos de informações e da atuação dos órgãos governamentais responsáveis por fiscalizar e orientar o setor produtivo, o comércio e o transporte. Esses órgãos atuam onde o consumidor não pode ir. Porém, todos os envolvidos na cadeia de produção de alimentos são responsáveis pela segurança dos alimentos: os produtores no campo, a indústria, o comércio e o consumidor final (BRASIL, 2009).

A qualidade de um alimento disponível no mercado é o resultado do seu histórico que começa na produção da matéria prima e fabricação do produto, passando pelo transporte, armazenamento e distribuição (ALMEIDA-MURADIAN; PENTEADO, 2007).

Todos dos produtos de origem animal, comestíveis e não comestíveis, sejam ou não adicionados de produtos vegetais, preparados, transformados, manipulados, recebidos, acondicionados, depositados e em trânsito estão sob a obrigatoriedade da prévia fiscalização, sob o ponto de vista industrial e sanitário, incluindo dentre outros os animais destinados à matança, seus produtos e subprodutos e matérias primas (BRASIL, 1952). O leite dos animais cujo diagnóstico clínico ou resultado positivo a provas diagnósticas indiquem presença de doenças

infecto-contagiosas que possam ser transmitidas ao homem não deve ser processado pelas indústrias (BRASIL, 2011).

O Ministério da Agricultura edita um conjunto de normas e regulamentos com o objetivo de conferir qualidade aos alimentos de origem animal, tanto durante o processamento, quanto nos estabelecimentos (BRASIL, 2013a). A ANVISA desenvolve desde o ano de 2000 o Programa Nacional de Monitoramento da Qualidade Sanitária de Alimentos (PNMQSA) que se fundamenta no controle e fiscalização de amostras de diversos produtos alimentícios expostos ao consumo e na avaliação do padrão sanitário por meio de análise dos parâmetros físico-químicos, microbiológicos, contaminantes, microscopia, aflatoxina, aditivos, dentre outros e da análise de rótulo no que concerne aos dizeres de rotulagem obrigatórios (BRASIL, 2013b). Criado também para verificar a qualidade dos alimentos expostos à venda nos estabelecimentos comerciais de Santa Catarina, o Programa Estadual de Monitoramento da qualidade Sanitária de Alimentos é mais um elemento do conjunto de ações de Vigilância Sanitária Estadual (Santa Catarina, 2013a). O Ministério Público de Santa Catarina em conjunto com outros órgãos implantou o Programa de Proteção Jurídico-Sanitária dos Consumidores de Produtos de Origem Animal no Estado com o objetivo de propiciar a articulação necessária com vistas a uma efetiva repressão à produção e à comercialização de produtos de origem animal impróprios para o consumo (Santa Catarina, 2013b).

2.2 Rastreabilidade

De acordo com Peixoto (2008), a rastreabilidade pode ser conceituada como um conjunto de sistemas de informações e registros de arquivos, que permite realizar um estudo retrospectivo dos produtos ao longo da cadeia produtiva, do ponto de consumo até a origem das matérias primas a partir das quais foram produzidos, passando pelos estabelecimentos onde foram industrializados, processados ou embalados. A rastreabilidade complementa o gerenciamento da qualidade de um produto, mas quando aplicada isoladamente, não representa garantia de segurança ao produto ou ao processo. Deve, portanto, estar agregada a outros sistemas de controle de qualidade, como a Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) e códigos de boas práticas.

Figura 1: Distribuição do alimento de origem animal: do campo a mesa.



Rastreabilidade representa a possibilidade de o consumidor conhecer “a vida pregressa” dos produtos e identificar os possíveis perigos à saúde coletiva a que foram expostos durante a sua produção e distribuição. Esses registros permitem identificar até mesmo a origem das matérias-primas e insumos utilizados na produção (BRASIL, 2013c).

Segundo a Associação Catarinense de Supermercados -ACATS- (2013) a segurança do alimento é essencial, principalmente para os consumidores que utilizam os supermercados para adquirir os alimentos e então desenvolveu o Programa de Rastreabilidade Alimento Sustentável nos Supermercados de Santa Catarina sendo o Programa pioneiro no país e está sendo utilizado como modelo para a expansão nacional.

2.3 Zoonoses Veiculadas por Alimentos

O controle higiênico e sanitário dos alimentos constitui fator preponderante para a prevenção das doenças de origem alimentar e relevante fator de desenvolvimento social. No âmbito internacional, é grande a preocupação com o aumento da ocorrência de doenças transmitidas por alimentos, sobretudo em relação aos patógenos emergentes e reemergentes veiculados por produtos alimentícios. Na atualidade os consumidores buscam alimentos que possam, simultaneamente, oferecer-lhes segurança e qualidade. As Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) podem ter, basicamente, duas fontes: química e microbiológica ou parasitária. Esta última pode ser de origem endógena, na qual os agentes se encontram nos alimentos antes de sua obtenção ou de origem exógena, na qual os alimentos são contaminados durante o processo produtivo. Nas DTAs de origem endógena destacam-se, nos alimentos de origem animal, os agentes

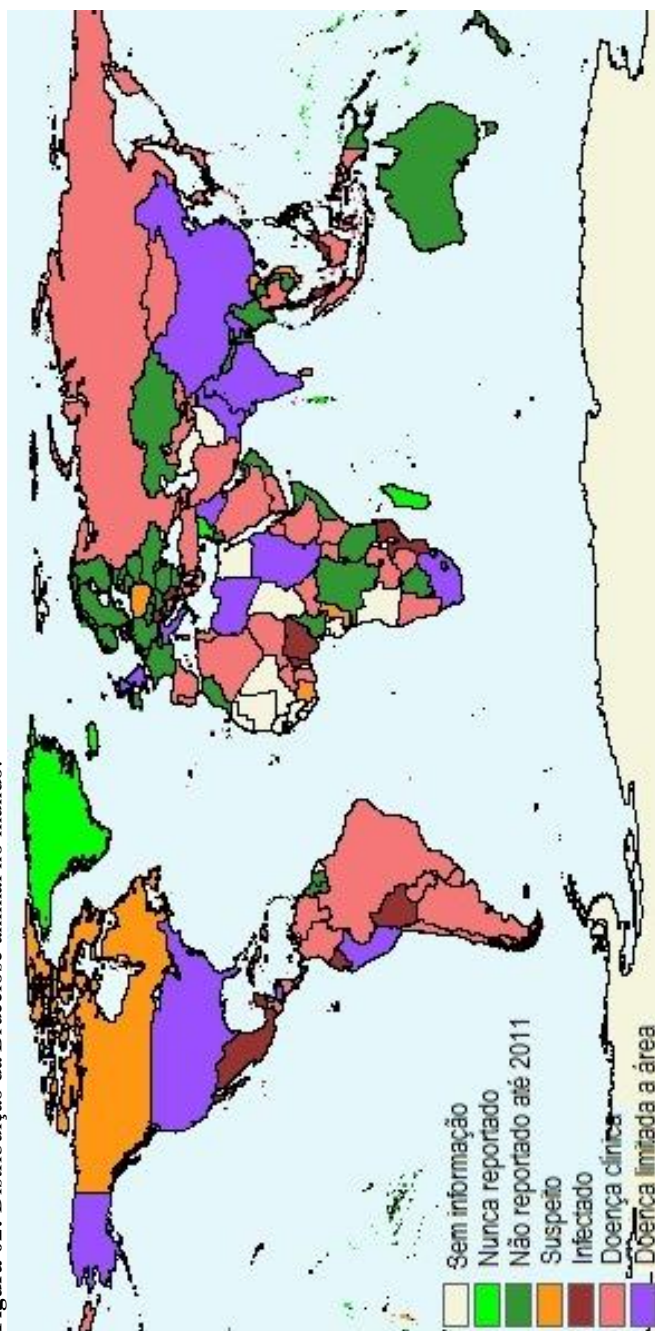
responsáveis por zoonoses, como por exemplo, a brucelose (GERMANO, 2011).

A ocorrência de DTA vem aumentando de modo significativo em nível mundial. Vários são os fatores que contribuem para a emergência dessas doenças, dentre os quais destacam-se: o crescente aumento das populações, a existência de grupos populacionais vulneráveis ou mais expostos, o processo de urbanização desordenado e a necessidade de produção de alimentos em grande escala. Contribui ainda, o deficiente controle dos órgãos públicos e privados, no tocante à qualidade dos alimentos ofertados às populações (BRASIL, 2010b). A expansão da agroindústria, a urbanização, a falta de medidas higiênicas e sanitárias no setor produtivo e na manipulação dos produtos de origem animal contribuem em parte para a brucelose ser um perigo para a saúde pública (WHO, 2006).

2.4 Brucelose

A brucelose é uma doença infectocontagiosa provocada por bactérias do gênero *Brucella*. Produz infecção característica nos animais, podendo infectar o homem. Sendo uma zoonose de distribuição mundial, conforme mostra a figura 02, acarreta problemas sanitários importantes e prejuízos econômicos vultosos. As principais manifestações nos animais como abortos, nascimentos prematuros, esterilidade e baixa produção de leite contribuem para uma considerável baixa na produção de alimentos. No homem, a sua manifestação clínica é responsável por incapacidade parcial ou total para o trabalho. As bactérias do gênero *Brucella* são parasitas intracelulares facultativos, com morfologia de cocobacilos Gram-negativos, imóveis; podem apresentar-se em cultivos primários com morfologia colonial lisa ou rugosa (rugosa estrita ou mucóide). Essa morfologia está diretamente associada à composição bioquímica do lipopolissacarídeo da parede celular (BRASIL, 2006). Medem de 0,4 a 2,5 μ de comprimento por 0,4 a 0,8 μ de largura. Encontram-se em geral isolados e, em menos frequência, aos pares, unidos pelas extremidades ou em pequenos grupos. Não formam cápsulas, esporos ou flagelos. São aeróbios, mas algumas cepas requerem um complemento de 5 a 10% de dióxido de carbono (CO₂) para seu crescimento (MENDES; MARCONDES-MACHADO, 2005).

Figura 02: Distribuição da Brucelose animal no mundo.



Fonte: OIE, 2011.

Muitas espécies de *Brucella* foram identificadas até o momento, como mostra a tabela 01. Apesar de ser uma enfermidade dos animais, a brucelose foi inicialmente descrita no homem no início do século XIX, a partir de casos de febre ondulante seguidos de morte, ocorridos na Ilha de Malta, no Mar Mediterrâneo, sendo por isso denominada Febre de Malta. A primeira descrição clínica da doença foi feita por Marston em 1859 e o isolamento do agente etiológico foi realizado por Bruce em 1887, que o denominou “*Micrococcus melitensis*”. A bactéria foi mais tarde renomeada como *Brucella melitensis* em sua homenagem. Em 1905 Zammit demonstrou, ainda em Malta, a natureza zoonótica da *B.melitensis* através do isolamento da bactéria do leite de cabras. Em 1917, os veterinários dinamarqueses Bang e Stribolt isolaram o agente causador do aborto enzoótico dos bovinos e o chamaram de “*Bacillus abortus*”. Em 1918, a pesquisadora norte-americana Alice Evans publicou um trabalho importante para o conhecimento da brucelose. Esta autora demonstrou as semelhanças morfológicas, imunológicas e de cultivo entre as bactérias isoladas por Bruce e Bang. Em razão disto, Meyer e Shaw propuseram em 1920, a criação do Gênero *Brucella*, em homenagem ao autor do primeiro isolamento do agente. Em 1914, Traut isolou, a partir de fetos abortados de suínos, uma bactéria que, a princípio, foi confundida com a causadora dos abortos nos bovinos. Posteriormente, ficou comprovado ser diferente em função de algumas propriedades culturais, bioquímicas e antigênicas, sendo por isto incluída no gênero com a denominação de *Brucella suis*. A partir de então outras espécies foram acrescentadas ao Gênero. Cronologicamente seguiram-se: *Brucella ovis*, *Brucella neotomae*, *Brucella canis*, *Brucella pennipediaлис*, *Brucella ceti* (baleias) e mais recentemente a *Brucella microti* (POESTER, 2013).

Tabela 1: Espécies de *Brucella* identificadas

Espécie	Biovars	Hospedeiro preferencial	Patogenicidade para o homem
<i>Brucella abortus</i>	1- 8 9	Bovídeos	Moderada
<i>Brucella canis</i>	-	Cães	Fraca
<i>Brucella ceti</i>	-	Cetáceos (golfinhos e baleias)	Desconhecida
<i>Brucella melitensis</i>	1- 3	Ovinos, caprinos	Alta
<i>Brucella neotomae</i>	-	Roedor (<i>Neotoma lepida</i>)	Não
<i>Brucella microti</i>	-	Roedor (<i>Microtus arvalis</i>)	Desconhecida
<i>Brucella ovis</i>	-	Ovinos	Não
<i>Brucella pinnipedialis</i>	-	Pinípedes (focas)	Desconhecida
<i>Brucella suis</i>	1, 3	Suídeos	Alta
	2	Suídeos e lebres	Pouco conhecida
	4	Renas	Moderada
	5	Roedores selvagens	Alta
<i>Brucella inopinata</i>	-	Humanos	?
<i>Brucella</i> sp. NVSL 07-0026	-	Babuíños	?

Fonte: Poester, 2011.

2.4.1 Prevalência da doença no rebanho bovino

A brucelose encontra-se mundialmente distribuída, sendo considerada uma das principais zoonoses. Embora tenha sido erradicada em diversos países da região norte e central da Europa, Austrália, Japão e Nova Zelândia, continua reemergente e se apresentando como um grave problema sanitário e econômico, principalmente em países da América do Sul, África, Oriente Médio e Ásia (OIE, 2009).

A brucelose bovina é uma doença endêmica no Brasil, tendo sido diagnosticada em todos os estados da Federação; contudo existem marcadas diferenças na prevalência da infecção por *B. abortus* entre os estados (LAGE, 2008). Segundo o Ministério da Agricultura, (2006a) está disseminada por todo o território nacional atingindo tanto o gado de corte quanto o gado de leite se estendendo também ao rebanho bubalino.

As prevalências são mais baixas na região sul e mais altas no centro oeste variando de 0,06 a 10,2%.

Figura 03: Prevalência da brucelose no rebanho bovino no Brasil.



Fonte POESTER, 2011.

Define-se como foco de brucelose a propriedade na qual se detectou bovinos ou bubalinos infectados, mediante comprovação laboratorial pelo serviço oficial (SANTA CATARINA, 2012).

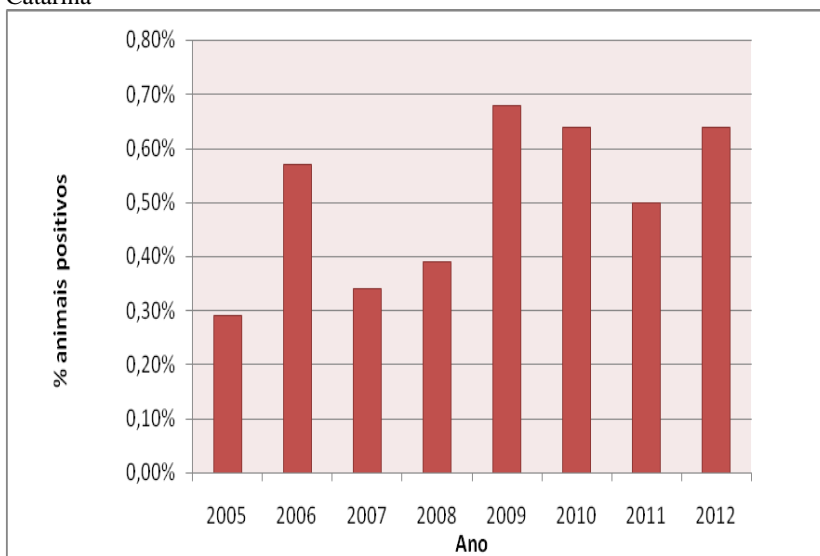
SIKUSAWA, (2009) realizou estudo para caracterizar a situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de Santa Catarina. Os resultados mostraram que a prevalência de focos foi de 0,32% e a prevalência de animais soropositivos foi de 0,06%. Estes resultados são semelhantes aos obtidos em dois estudos anteriores realizados no Estado de Santa Catarina, o primeiro em 1975, e o segundo em 1996, que estimaram a prevalência em 0,2% e 0,6%, respectivamente (PAULIN e FERREIRA NETO, 2003). Isso demonstra que o Estado tem historicamente, baixa prevalência da doença, conforme mostra a figura 04, provavelmente em virtude da boa estruturação dos serviços oficiais de saúde aliadas às características produtivas do estado, constituído por pequenas propriedades rurais com poucos animais. É importante destacar que o estado nunca teve a

vacinação contra a brucelose como ação obrigatória e, portanto, acredita-se que a baixa prevalência seja consequência da pequena movimentação de animais entre as propriedades e da realização de testes diagnósticos, com subsequente sacrifício dos positivos, quando ela ocorre (SIKUSAWA, 2009).

Em 2004, considerando que as propriedades e animais infectados tinham prevalência muito baixa e ainda que o uso da vacina poderia interferir nos resultados dos testes de diagnóstico, recurso sistematicamente utilizado em áreas em processo de erradicação, o MAPA excluiu o Estado da obrigatoriedade de vacinação das fêmeas bovinas e bubalinas contra a brucelose (BRASIL, 2004).

Apesar de a enfermidade apresentar baixa incidência ainda assim é responsável por prejuízos econômicos aos criadores e transmissível aos seres humanos, diante disso a Secretaria de Estado da Agricultura e da Pesca Instituiu em 2012 o Programa de Erradicação da Brucelose Bovina e Bubalina no Estado de Santa Catarina. O Programa tem como objetivo a eliminação da enfermidade nos rebanhos. Entre as estratégias destaca-se a realização de inquérito soropidemiológico nos animais para determinação do índice de prevalência da doença em 2012, a interdição das propriedades com foco e submissão dessa ao controle de ingresso e egresso de bovinos e bubalinos. Além dessas medidas, todos os animais soro-reagentes em teste confirmatório serão sacrificados sanitariamente e adotadas as medidas de saneamento da propriedade como previsto no regulamento (SANTA CATARINA, 2012). Os proprietários serão ressarcidos pelo Fundo Estadual de Sanidade Animal (FUNDESA,) que prevê a indenização pelo sacrifício sanitário de animais com doenças infectocontagiosas (SANTA CATARINA, 2001).

Figura 4: Exames sorológicos para brucelose bovina realizados em Santa Catarina



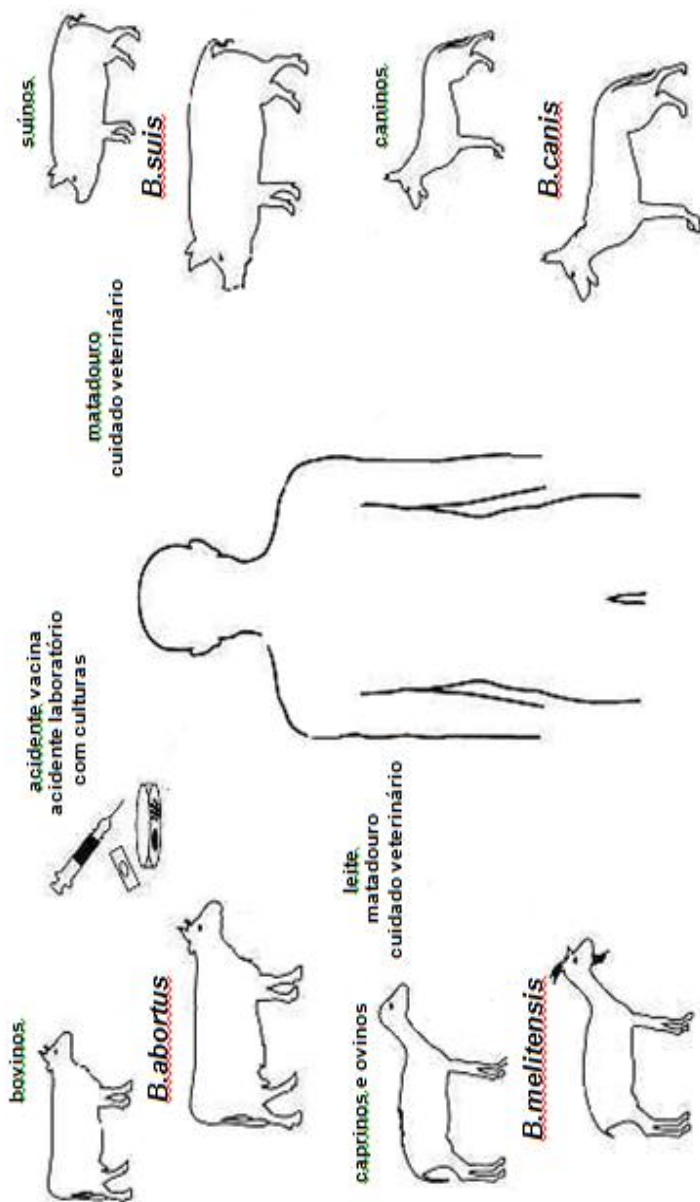
Fonte: BAUMGARTEN, 2012

2.4.2 Epidemiologia

A brucelose é uma zoonose que acomete primariamente varias espécies de animais domésticos e silvestres, podendo infectar o homem. As *Brucellas* não são hospedeiro-específicas e sob determinadas condições podem transmitir-se a outras espécies animais. As formas mais comuns de infecção humana são devidas à atividade profissional das pessoas envolvidas ou através da ingestão de alimentos contaminados. A *B. melitensis*, que infecta caprinos e ovinos, é a mais patogênica para o homem e esta espécie nunca foi reconhecida no Brasil (POESTER, 2009).

A infecção no homem ocorre diretamente, mediante o contato com animais, ou indiretamente, por ingestão de produtos de origem animal (figura 05), além da possibilidade de inalação de aerossóis em laboratórios ou nas dependências dos próprios abatedouros (GERMANO, 2011).

Figura 05: Modos de transmissão das diferentes espécies de Brucella para o homem



Fonte: POESTER, 2011.

2.4.3 Brucelose Bovina

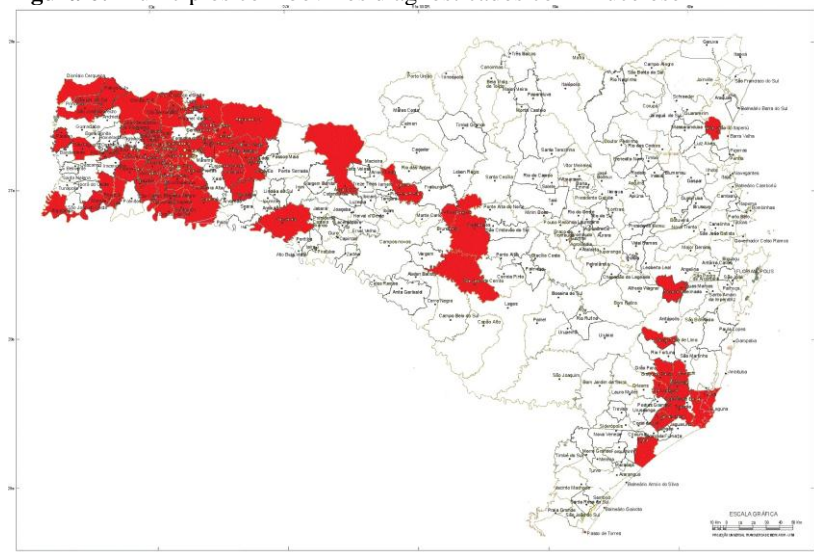
É uma doença que afeta os rebanhos provocando abortos, geralmente nas fêmeas mais jovens, e que pode, dependendo da espécie e da suscetibilidade individual, determinar infertilidade, acarretando prejuízos de ordem econômica aos criadores. Estimativas oficiais apontam que na América Latina, essas perdas atingem a cifra de US\$ 600 milhões por ano. Nas propriedades produtoras de leite pode ocasionar queda de 20 a 25% na produção, por conta da interrupção do período de lactação por aborto e pelo maior prazo de concepção (GERMANO, 2011).

A brucelose animal pode ser diagnosticada por diferentes métodos isoladamente ou em conjunto. Entre eles destacam-se o diagnóstico clínico, baseado nos sinais clínicos de aborto, nascimento de bezerros fracos e esterilidade de fêmeas e machos; dados epidemiológicos baseados na história dos rebanhos; isolamento e identificação do agente etiológico e ainda pela demonstração de anticorpos nos fluídos orgânicos (LAGE, 2008).

O tratamento de bovinos e suínos com antibióticos não é prático nem tampouco econômico, pois além do alto valor dos medicamentos e do longo período exigido, não raro ocorrem recidivas. Além disso, o uso prolongado de antibióticos pode ter reflexos na saúde pública, uma vez que tendem a persistir na carne e no leite (POESTER, 2009).

A estratégia de ação do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) inclui a certificação de propriedades livres e de propriedades monitoradas, vacinação das fêmeas e controle do trânsito de animais, entre outras medidas sanitárias com o objetivo de baixar a prevalência da doença no rebanho (BRASIL, 2006). O PNCEBT tem grande importância para a cadeia produtiva de carne e leite, para a segurança dos consumidores de produtos de origem animal e para a imagem que o País projeta no mercado mundial. Devido aos altos custos inerentes aos procedimentos necessários para se atingirem os objetivos do programa, julgou-se necessária a realização de estudos para elucidar a situação epidemiológica da brucelose no rebanho bovino brasileiro, indicar as melhores condutas e estratégias para os vários Estados e regiões e criar um mecanismo de verificação da efetividade das ações implementadas. Dentre os Estados que concluíram os estudos epidemiológicos da brucelose bovina inclui-se o Estado de Santa Catarina (POESTER, 2009).

Figura 6: Municípios com bovinos diagnosticados com Brucelose



Fonte: CIDASC, 2012

2.4.4 Brucelose Humana

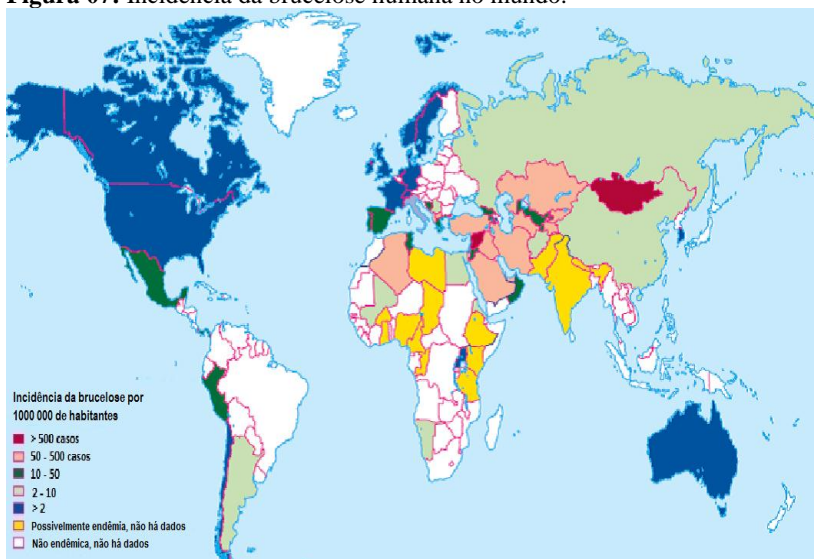
A doença foi identificada em todo o mundo, conforme demonstra a figura 07, mas especialmente na bacia do Mediterrâneo, na península arábica, no subcontinente indiano, partes do México, da América Central e do Sul. A sua distribuição geográfica coincide com a endemia animal, sendo, sobretudo, uma doença ocupacional que atinge, em especial, a faixa etária dos 55-64 anos, com predomínio masculino. Atualmente, a sua incidência deverá ser cinco vezes superior aos números oficiais, sobretudo devido ao não diagnóstico das formas frustras e ao não cumprimento da declaração obrigatória. (PESSEGUERO, 2003).

A brucelose é também conhecida como “febre ondulante”, “febre do Mediterrâneo” ou “febre de Malta” afeta pessoas de todas as idades e ambos os sexos. Tem havido muito progresso no controle dessa doença em muitos países, mas ainda permanece em regiões onde a infecção persiste nos animais domésticos e consequentemente a transmissão para o homem frequentemente ocorre. É uma importante doença que ocorre em muitas partes do mundo, especialmente no Mediterrâneo, países da Europa, norte e leste da África, no meio oeste,

sul e centro da Ásia e América Central e do Sul. Com muita frequência a doença não é diagnosticada ou notificada (FAO, 2006).

A doença no humano permanece como a doença zoonótica mais disseminada no mundo, com mais de 500.000 novos casos por ano, levando a substancial incapacidade e uma importante causa de morbidade associada a viajantes (figura 07). A global epidemiologia da doença envolveu drasticamente as décadas passadas. A América do Sul, tradicionalmente tem sido considerada endêmica para a brucelose humana, *B. melitensis*, sendo prevalente no Peru e oeste da Argentina e a *B. abortus* no leste da Argentina e outros países da América do Sul. Não há dados disponíveis no Brasil, país que detém o maior rebanho bovino comercial do mundo, e tem presumivelmente um risco de alta prevalência de brucelose humana por *B. abortus*. A falta de notificação deve ser um obstáculo para avaliar a verdadeira incidência no Brasil e nos países vizinhos (PAPPAS *et al.*, 2006).

Figura 07: Incidência da brucelose humana no mundo.



Fonte: PAPPAS, *et al.*, 2006.

Nos humanos se caracteriza como uma doença febril aguda ou subaguda, marcada por febre intermitente ou recorrente acompanhada de mal estar, anorexia e prostração, que na falta de tratamento específico pode persistir por semanas ou meses. Pode ocorrer aumento de fígado, baço e linfonodos. A fase aguda pode evoluir para a crônica, com

recaídas, desenvolvimento de infecções localizadas persistentes ou uma síndrome não específica semelhante à síndrome da fadiga crônica. A doença é aguda em cerca de metade dos casos, com período de incubação de 2 ou 3 semanas. Na outra metade o começo é insidioso, com sinais e sintomas se desenvolvendo por semanas a meses do início da infecção. As manifestações clínicas são variáveis e não específicas que incluem febre, sudorese, fadiga, prostração, anorexia, perda de peso, dor de cabeça, dor articular e dor nas costas. É comum os pacientes sentirem-se melhor pela manhã com os sintomas progredindo com o passar do dia. O desejo de descansar é profundo e a depressão é evidente. A duração da doença no humano e sua longa convalescença faz com que seja um grande problema econômico e médico para o paciente devido à perda das atividades normais. O diagnóstico rápido e o tratamento com antibióticos reduzem enormemente o tempo de incapacidade. Entretanto, existem muitas regiões onde o diagnóstico e tratamento não estão disponíveis ou onde os programas para a detecção e prevenção da infecção em humanos e animais não são adequadamente executados. Nessas áreas, a doença animal permanece como uma constante ameaça para a saúde pública, particularmente para os setores sócios econômicos mais vulneráveis da população (FAO, 2006).

Tabela 2: Dose infectante relativa para o homem

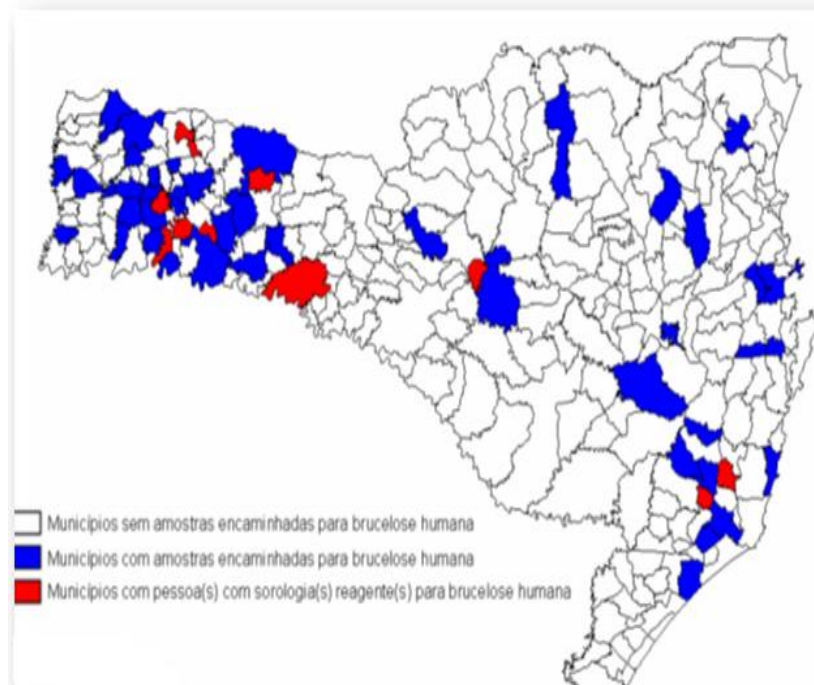
Virulência para humanos	Espécies	Dose relativa
Mais virulenta	<i>B.melitensis</i>	~ 1-10 organismos
↓	<i>B.suis</i>	~ 1000
	<i>B.abortus</i>	~ 100.000
Menos virulenta	<i>B.canis</i>	~ 1.000.000

Fonte: YOUNG, 1995.

A brucelose humana no Brasil ainda é uma doença de pouca visibilidade. Por ser um agravo de complicado diagnóstico, pouco se sabe sobre a sua real situação no país. Ressalta-se, também, a relevância da atualização periódica dos médicos no que concerne à visibilidade da brucelose. Muitas vezes não ocorre a suspeita clínica devido ao despreparo dos profissionais de saúde em lidar com zoonoses. A parceria entre instituições públicas e privadas, dos setores de saúde pública humana e animal, parece ser o caminho para o controle e erradicação de zoonoses como a brucelose (CARDOSO, 2012).

Em 2012, a Diretoria de Vigilância Epidemiológica de Santa Catarina (DIVE) divulgou o Protocolo Estadual de Vigilância e Manejo Clínico de Brucelose Humana com vistas a atender a demanda dos possíveis casos da doença no Estado. Também no mesmo ano, segundo o Laboratório Central de Saúde Pública (LACEN) 30 pessoas foram sorologicamente reagentes para brucelose, sendo que 11 dessas apresentaram também os sintomas e/ou sinais da doença necessitando de tratamento. Apenas em 35 (39,32%) propriedades foram realizadas as investigações das pessoas que tiveram algum contato direto ou indireto e com vínculo epidemiológico com animais infectados (SANTA CATARINA, 2012).

Figura 8: Municípios que encaminharam amostras para diagnóstico de brucelose humana



Fonte: LACEN/SC 2012

2.4.5 Transmissão da Brucelose por Alimentos

O alimento é a usualmente a principal fonte de brucelose para a população urbana. A ingestão de leite cru ou de derivados preparados com leite não pasteurizado é a principal fonte de infecção para a maioria da população. O leite contaminado com *Brucella* é particularmente perigoso porque é consumido regularmente e em grande volume e ainda conter grande número de micro organismos. Manteiga, creme ou sorvete preparado com leite cru também representa um risco alto. O processo de produção de queijo pode concentrar essa bactéria que pode sobreviver por vários meses neste tipo de produto. Queijos duros, preparados com ácido láctico ou fermentação propiônica apresentam risco menor assim como para os iogurtes e leites fermentados. A *Brucella* morre quando lentamente quando o potencial hidrogeniônico (pH) está abaixo de 4, e

rapidamente quando abaixo de 3,5. Equipamentos usados no transporte ou processamento de leite contaminado ou outro produto de origem animal cru também oferecem risco pela contaminação cruzada (WHO, 2006). Estudos realizados por Freitas e colaboradores (2001), com o objetivo de demonstrar o risco potencial de infecção brucélica zoonótica associado a suínos abatidos clandestinamente, analisaram 139 amostras de soro de animais de diversas procedências. Os resultados obtidos demonstraram que 42,2% das amostras continham anticorpos para *Brucella* spp, o que significa um elevado risco sanitário para as pessoas envolvidas no abate clandestino, consumidores e população em geral.

As bactérias do gênero *Brucella* são muito resistentes aos fatores ambientais. *B. abortus* pode permanecer por longos períodos (seis meses ou mais) em material de aborto ou parto nas pastagens. A permanência destas bactérias no ambiente aumenta em determinadas condições como a presença de sombra, umidade e baixas temperaturas. A figura 08 mostra a resistência da bactéria em produtos lácteos. Portanto, é recomendado que se procure deixar os locais com altas taxas de contaminação expostos ao sol, que é um potente germicida (BRASIL, 2006). *B. abortus* é sensível à pasteurização e aos desinfetantes como cal, cloro, cresol, fenol e formol, em concentrações ideais, que devem ser utilizados na desinfecção de instalações, utensílios e ambiente (POESTER, 2009). A sobrevivência de *Brucella* spp no leite e produtos lácteos depende da temperatura, pH e da presença de outros microrganismos que possam inibir a multiplicação, podendo permanecer no alimento de 15 a 90 dias. A refrigeração inibe a multiplicação, porém a viabilidade é mantida mesmo em temperatura de congelamento. Felizmente, a fervura, processos de pasteurização e os métodos de esterilização são eficazes na eliminação do micro organismo (PAULIN e FERREIRA NETO, 2003).

Segundo Falenski e colaboradores (2011), *Brucella* spp. pode sobreviver por longos períodos de tempo em leite UHT e também em água mineral, quando artificialmente contaminados. Portanto a contaminação desses produtos, de forma natural ou artificial pode significar uma séria ameaça à saúde publica. Considerando este cenário, métodos mais sensíveis para a rápida detecção e tipificação desse patógeno em alimentos devem ser desenvolvidos.

Tabela 3: Resistência da *Brucella abortus* em diferentes produtos lácteos

Resistência	
Leite.....	17 dias
Leite Congelado.....	>800 dias
Queijos.....	até 6 meses
Manteiga.....	até 4 meses
Iogurte – 43 a 46°C / pH 3,9.....	2,5 a 3,5 horas
Iogurte – 18 a 34°C / pH 3,7.....	89 a 96 dias
60°C.....	10 min.
71,7°C.....	15 seg.

Fonte: POESTER, 2009.

Produtos cárneos são menos freqüentemente associados com infecções, porque usualmente não são consumidos crus. Em muitos países, o consumo de comidas saudáveis tem se tornado popular, o que inclui o consumo de leite cru. Em áreas endêmicas, o consumo de produtos étnicos pelos turistas, pode ser particularmente um risco (WHO, 2006).

De acordo com Zaffari e colaboradores (2007) no Rio Grande do Sul, como na maioria dos Estados brasileiros, existe a tradição do consumo de produtos artesanais por serem considerados, pela população, mais naturais e saborosos. Por outro lado, a venda destes produtos é uma das principais fontes de renda de pequenos produtores que os comercializam diretamente ao consumidor, geralmente em estabelecimentos à beira de estradas. Dentre os produtos artesanais mais apreciados está o queijo, cuja fabricação, como a de outros alimentos, necessita seguir normas rigorosas de higiene; além disso, a matéria prima deve originar-se de animais em condições sanitárias adequadas.

Segundo Nero et al. (2004) a instabilidade do mercado de leite no Brasil força pequenos produtores de leite a procurar alternativas de comércio de sua produção, o que inclui a venda de leite cru para indivíduos que dão preferência a esse tipo de leite.

2.5 Qualidade do Leite no Processamento de Derivados

Entende-se por leite, sem outra especificação, o produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas. O leite de outros animais deve denominar-se segundo a espécie que o proceda (BRASIL, 1952).

O leite é considerado o mais completo alimento e possui elevado valor biológico na alimentação humana, particularmente nos primeiros estágios de vida, quando constitui alimento exclusivo. No Brasil, a indústria de laticínios é bastante expressiva, apresentando elevado nível de desenvolvimento tecnológico, o que pode ser demonstrado pela grande variedade de produtos derivados existentes no mercado. Existe consenso, atualmente, que o controle de qualidade do leite utilizado com matéria prima é fundamental para garantir a qualidade dos produtos derivados. A venda destes produtos diretamente ao consumidor, sem qualquer tratamento prévio, sobretudo a pasteurização, expõe a população ao risco de doenças como brucelose e tuberculose, entre outras (GERMANO, 2011). O consumo de leite não pasteurizado oferece diversos riscos à saúde, dentre eles, a brucelose. Torna-se necessária a conscientização da população quanto ao consumo deste tipo de leite, bem como seus derivados. Ressalta-se, neste contexto, a importância da pasteurização do leite para a eliminação de patógenos. As doenças transmitidas pelo consumo do leite cru mais conhecidas são: tuberculose, brucelose, difteria, febre Q e diversas gastroenterites. Os processos de aquecimento são os mais amplamente utilizados no âmbito industrial, como forma de eliminar ou reduzir a carga bacteriana, podendo variar conforme os diferentes valores do binômio tempo-temperatura. Dentre os tratamentos térmicos, os mais empregados são a pasteurização e a esterilização (TRONCO, 2008). De acordo com o Artigo 157 do Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA, 1952), entende-se por pasteurização o emprego conveniente do calor, com o fim de destruir totalmente a flora bacteriana, sem alteração sensível da constituição física e equilíbrio químico do leite e sem prejuízo de seus elementos bioquímicos, assim como de suas propriedades organolépticas normais. Queijos moles preparados com leite cru podem concentrar um grande número de Brucellas. A preparação destes produtos com leite cru deve ser desaconselhada. Se isso não for possível o queijo deve ser estocado por seis meses antes de ser consumido. Coalhos usados na fabricação de queijos podem também ser uma fonte de infecção quando forem provenientes de estômagos de animais brucélicos (FAO, 2006). De acordo com o Regulamento Técnico de Qualidade e Identidade de queijos não é necessária a pasteurização ou outro tratamento térmico no leite higienizado que se destine à elaboração dos queijos submetidos a um processo de maturação a uma temperatura superior a 5° C, durante um tempo não inferior a 60 dias (BRASIL, 2011).

MIYASHIRO (2004) analisou 192 amostras de queijo clandestinas provenientes de várias regiões do Estado de São Paulo e Minas Gerais para isolamento e detecção de DNA de *Brucella* spp. através das técnicas de cultivo microbiológico e reação da polimerase em cadeia (PCR), respectivamente. Para as amostras positivas foi pesquisada a ocorrência da espécie *Brucella abortus* (biovars 1, 2 e 4), além da diferenciação do DNA em cepa vacinal B19 ou de campo por PCR. Não foi possível isolar o micro organismo de nenhuma amostra, porém, na PCR, 37 amostras (19,27%) foram positivas na reação com primers gênero específico e destas, todas (100%) foram comprovadas como sendo *Brucella abortus*. A diferenciação da cepa revelou que 30/37 amostras (81,08%) eram cepa vacinal B19 e sete (18,92%) eram cepas de *Brucella abortus* de campo. Os resultados mostraram uma maior sensibilidade diagnóstica da PCR em relação ao cultivo microbiológico, e a padronização da reação de diferenciação da cepa em vacinal ou campo permitiu que todas as amostras positivas para *B. abortus* fossem analisadas, sendo uma metodologia confiável e aplicável a infecções naturais pelo microrganismo. PCR é uma opção para o diagnóstico de brucelose. Entretanto, poucos estudos têm sido feito em amostras de campo com esta ferramenta de diagnóstico. No Brasil, apesar da importância da brucelose bovina, poucos estudos foram feitos para diferenciar os sorotipos de *Brucella* entre os bovinos.

Os consumidores preocupam-se muito pouco com a origem da matéria prima do queijo que consomem, valorizando, no caso do leite fluido, o fato de vir direto da fazenda, sem passar pelo processo de pasteurização, agravando o risco de transmissão de doenças (MIYSHIRO, 2004).

O leite informal tem efeitos perversos sobre a competitividade e a modernização do leite brasileiro porque exacerba o comportamento oportunista e a ruptura de relações contratuais estáveis, amplia as variações de preço típicas da atividade e por último, agrega a sonegação fiscal. A produção clandestina não tem compromisso com o consumidor, nem com seus fornecedores. Portanto, sua vantagem competitiva está calçada em vantagens de custo advindas de baixos investimentos em controle de qualidade e sonegação fiscal. Estimando-se o mercado informal, concluíram que corresponderia a algo entre 28 e 29% do total da produção leiteira desde 1997 sendo consumido na forma de leite in natura, queijos, doce de leite e outros derivados (FARINA, 2000).

2.6 Aplicação da Técnica PCR em Alimentos

PCR é um método *in vitro* usado para aumentar o número de sequências específicas de DNA em uma amostra. Esta técnica é largamente usada na pesquisa microbiológica em alimentos devido a sua alta sensibilidade e especificidade (MANDAL, 2011). A tecnologia da PCR tem sido aplicada para detecção de contaminação por *Brucella* spp. em alimentos, principalmente leite e queijos frescos. A técnica provou ser altamente sensível, simples, rápida e facilmente adaptável para demandas de grandes volumes, podendo ser considerada como grande ferramenta diagnóstica (BRICKER, 2002).

O genoma de *Brucella* spp contém a sequência de inserção (IS) chamada de IS711 ou IS6501, que é específica para o gênero. O número de cópias e a localização genômica desta sequência difere entre as espécies, variando de 7 a 10 cópias na *B. abortus*, *B. melitensis* e *B. suis*, e mais de 30 cópias na *B. ovis* e em cepas de *B. neotomae* (HINIC et al., 2008). Diante da grande similaridade genética entre os membros do gênero *Brucella*, torna-se interessante a utilização de oligonucleotídeos específicos baseados nas sequências de inserção IS711 que possibilitam a diferenciação entre algumas espécies do gênero (HINIC et al., 2009)

LEYLA et al. (2003) relataram que ao detectar *Brucella* spp. em amostras de conteúdo estomacal de fetos ovinos abortados pela PCR baseada no gene IS711 alcançaram sensibilidade de 97,4% e uma especificidade de 100% quando comparada ao cultivo bacteriológico.

A identificação da *Brucella* através da técnica de cultura depende de uma grande quantidade de provas fenotípicas como requisito para CO₂ e testes metabólicos, que, entre outros problemas, envolve tempo, biossegurança, pessoal treinado e resultados um pouco ambíguos. Para superar alguns desses problemas, foram envidados esforços no desenvolvimento de ensaios de diagnósticos moleculares baseados na amplificação de genes alvos através da reação em cadeia da polimerase (PCR). Os primeiros testes para brucelose baseados em PCR foram introduzidos em 1990. O diagnóstico dessa doença em qualquer espécie não é uma questão trivial sendo considerado como teste conclusivo o isolamento do agente. Por causa dos problemas inerentes com isolamento bacteriano como a baixa sensibilidade, demora, alto custo, riscos e outros fatores, a maioria dos laboratórios prefere usar outros métodos mais eficazes. A biologia molecular como uma ferramenta de diagnóstico está avançando e em breve estará no ponto substituir o isolamento bacteriano. É rápida, segura e eficaz, restando algumas incertezas sobre a especificidade (POESTER, 2010).

Segundo Sola (2011) o método de diagnóstico molecular PCR em Tempo Real, que detecta o DNA de *Brucella* spp. em fluidos e tecidos animais provenientes de matadouros-frigoríficos de bovinos, pode constituir uma ferramenta de grande valia, a fim de garantir um diagnóstico seguro, rápido e preciso que auxilie no processo de tomada de decisão quanto ao critério de julgamento das carcaças e vísceras dos animais de abate, conferindo assim o destino seguro e adequado.

2.7 Referências Bibliográficas

ALMEIDA-MURADIAN, L. B; PENTEADO, M. V.C. **Vigilância sanitária: tópicos sobre legislação e análise de alimentos.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. 203p.

ASSOCIAÇÃO CATARINENSE DE SUPERMERCADOS. **ACATS desenvolve programa de rastreabilidade de alimentos.** Florianópolis, 2013. Disponível em:

<<http://www.abre.org.br/noticias/acats-desenvolve-programa-de-rastreabilidade-de-alimentos/>>. Acesso em: 13 fev 2013.

BAUMGARTEN, K. **Seminário sobre as perspectivas do PNCEBT no âmbito do gerenciamento das informações e alternativas de controle.** Porto Alegre, 2012. Disponível em:

<<http://www.dda.agricultura.rs.gov.br/conteudo/3033/?SEMIN%C3%81RIO SOBRE AS PERSPECTIVAS DO PNCEBT NO %C3%82MBITO DO GERENCIAMENTO DAS INFORMA%C3%87%C3%95ES E ALTERNATIVAS DE CONTROLE>>. Acesso em 14 agos 2013.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia de Alimentos e Vigilância Sanitária.** Brasília: ANVISA, 2009. 40 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT).** Brasília: 2006a. 184p. Disponível em:

<http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Aniamal/programa%20nacional%20sanidade%20brucelose/Manual%20do%20PNCEBT%20-%20Original.pdf>. Acesso em: 12 junho 2011.

BRASIL. Lei nº 11.346, de 15 de setembro de 2006. Cria o Sistema Nacional de Segurança Alimentar e Nutricional – SISAN com vistas em assegurar o direito humano à alimentação adequada e dá outras providências. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, 18 set. 2006b. Seção 1, p.185. Disponível em:

<http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2004-2006/2006/lei/111346.htm>. Acesso em: 10 agosto 2011.

BRASIL. Decreto Nº30. 691 de 29 de março de 1952. Regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal - RIISPOA. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, 7 de julho de 1952. Seção 1, p.10785. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/19501969/D30691.htm>. Acesso em: 12 mar 2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Controle de Resíduos**. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal/qualidade-dos-alimentos>>. Acesso em: 12 jan 2013a.

BRASIL. Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. **Programa Nacional de Monitoramento da Qualidade Sanitária de Alimentos**. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/programa/index.htm>>. Acesso em 15 jan 2013b.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Rastreabilidade**. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal/rastreabilidade>>. Acesso em: 13 jan 2013c.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Situação epidemiológica das zoonoses de interesse para a saúde pública**. Boletim eletrônico epidemiológico. Ano 10, nº 2, abril 2010a. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/ano10_n02_sit_epidemiologia_zoonoses_br.pdf>. Acesso em: 22 de abril de 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual integrado de prevenção e controle de doenças transmitidas por alimentos**. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2010b. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_doencas_transmitidas_por_alimentos_pdf.pdf>. Acesso em: 28 de abril de 2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011: Aprova o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru

Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, 30 dez. 2011. Seção 1, p. 6. Disponível em: <<http://www.in.gov.br/visualiza/index.jsp?data=30/12/2011&jornal=1&pagina=6&totalArquivos=160>>. Acesso em: 23 de agosto de 2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº. 11, de 26 de janeiro de 2004. Exclui o Estado de Santa Catarina da obrigatoriedade de vacinação das fêmeas bovinas e bubalinas contra a brucelose. **Diário Oficial da União**, Brasília, 29 jan. de 2004. Seção 1, Página 3. Disponível em: <http://www.google.com.br/#bav=on.2,or.r_qf.&fp=acbe00cda996269&q=Portaria+n%C2%BA.+11%2C+de+26+de+janeiro+de+2004+agricultura+vacina%C3%A7%C3%A3o>. Acesso em 20 mar. 2011.

CARDOSO, S; COSTA, L. **A brucelose no Brasil sob o enfoque da saúde pública.** Disponível em: <[http://www.cpgls.ucg.br/7mostra/Artigos/SAUDE%20E%20BIOLOGIACAS/A%20BRUCELOSE%20NO%20BRASIL%20SOB%20O%20ENFOQUE%20DA%20SA%C3%9ADE%20P%C3%9ABLICA-TCC-revista%20PUC\[1\].pdf](http://www.cpgls.ucg.br/7mostra/Artigos/SAUDE%20E%20BIOLOGIACAS/A%20BRUCELOSE%20NO%20BRASIL%20SOB%20O%20ENFOQUE%20DA%20SA%C3%9ADE%20P%C3%9ABLICA-TCC-revista%20PUC[1].pdf)>. Acesso em: 13 maio 2012.

FARINA, E. M. M. Q. et al. Leite clandestino: um problema real. **Boletim do Leite**, São Paulo: v. 7, n. 81, p. 1-2, 2000. Disponível em: <<http://www.cepea.esalq.usp.br>>. Acesso em 20 abril de 2012.

FREITAS et al. Risco de brucelose zoonótica associada a suínos de abate clandestino. **Revista Saúde Pública**. São Paulo: vol.35, supl. 1, p.101-102, 2001.

GERMANO, M.L. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos.** Barueri: Manole, 2011. 1088p.

HINIC, V. et al. Novel identification and differentiation of *Brucella melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis*, and *B. neotomae* suitable for both conventional and real-time PCR systems. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, [online], v. 75, p. 375-378, 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18675856>. Acesso em: 15 nov. 2012.

HINIC, V. et al. IS711-based real-time PCR assay as a tool for detection of *Brucella* spp in wild boars and comparison with bacterial isolation and serology. **BMC Veterinary Research**, London, [online], v. 5, n. 22, 2009. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/1746-6148/5/22>. Acesso em: 2 jul. 2012.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Indicadores IBGE. Estatística da Produção Pecuária** - Outubro de 2010. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producao_agropecuaria/abate-leite-couro-ovos_201002_publ_completa.pdf. Acesso em: 18 dez. 2012.

LAGE, A. P. et al. Brucelose bovina: uma atualização. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. Belo Horizonte: v.32, n.3, p.202-212, jul./set. 2008.

LEYLA, G.; KADRI, G.; UMRAN, O. K. Comparison of polymerase chain reaction and bacteriological culture for the diagnosis of sheep brucellosis using aborted fetus samples. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, [online], v. 93, n. 1, p. 53-61, mai. 2003. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12591206>. Acesso em: 8 out. 2011.

MANDAL, P.K. et al. Methods for rapid detection of foodborne pathogens: An overview. **American Journal of Food Technology**. Nova York: v.6, p. 87-102, 2011.

MELLO, Milton Thiago. **A profissão veterinária brasileira no limiar do futuro**. 2. ed. Brasília: Academia Brasileira de Medicina Veterinária e Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, 2011. 208p.

MENDES, R. P; MARCONDES-MACHADO, J. Brucelose. In: COURA, J. (Comp.). **Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. Cap. 128, p. 1529-1538.

MIYASHIRO, S. **Presença de Dna de *Brucella abortus* em subprodutos lácteos clandestinos: Diferenciação da origem da cepa vicinal (B19) ou campo pela Reação da Polimerase em Cadeia**

(PCR). Tese de mestrado. Faculdade de medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. 2004.

NERO, L.A. et al. Perigos em leite não-pasteurizado comercializado no Brasil: ocorrência de *Salmonellaspp*, *Listeriamonocytogenese* de resíduos químicos. **Braz. J. Microbiol.** [online]. 2004, vol.35, n.3, pp. 211-215. ISSN 1517-8382. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822004000200007>>. Acesso em 25 julho 2012.

OIE. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE ANIMAL. **Mapa da distribuição da brucelose animal no mundo.** 2011. Disponível em:

<http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/Diseasedistributionmap>. Acesso em 26 maio 2012.

OIE. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE ANIMAL. **Bovine brucellosis Terrestrial Animal Health Code.** 2009. Chapter 11.3. Disponível em: <http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahc/2009/en_chapitre_11.3.htm>. Acesso em: 13 maio 2012.

PAPPAS, G. *et al.* The new global map of human brucellosis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 6, i. 2, p. 91-99, fev. 2006. Disponível em: <[http://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS14733099\(06\)70382-6/fulltext](http://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS14733099(06)70382-6/fulltext)>. Acesso em: 10 de junho de 2012.

PAULIN L. M.; FERREIRA NETO J. S. **O Combate à Brucelose Bovina: situação brasileira.** Jaboticabal: Funep, 2003. 154p.

PEIXOTO, M. **Rastreabilidade alimentar: reflexões para o caso da carne bovina.** Brasília, setembro de 2008. Disponível em: <<http://www12.senado.gov.br/publicacoes/estudos-legislativos/tipos-de-estudos/textos-para-discussao/td-47-rastreabilidade-alimentar-reflexoes-para-o-caso-da-carne-bovina>>. Acesso em: 22 fev 2013.

PESSEGUEIRO, P; BARATA, C; CORREIA, J. Brucelose, uma revisão sistematizada. **Medicina Interna**, V. 10, n. 2, P. 91-96, 2003.

POESTER, F. et al. Estudos de prevalência da brucelose bovina no âmbito do Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose: Introdução. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte: v. 61, supl. 1, p.1-5, 2009.

POESTER, F. **Brucelose**. Disponível em: <<http://setordevirologiaufsm.files.wordpress.com/2013/01/brucelose-02.pdf>>. Acesso em 11 jan 2013.

POESTER, F. **I Seminário de zoonoses: Brucelose animal**. Florianópolis, 2011.

POESTER, F. et al. .Diagnosis of Brucellosis. **The Open Veterinary Science Journal**, v.4, p.46-60, 2010.

SANTA CATARINA. Secretaria de Estado da Saúde. Diretoria de Vigilância Sanitária. **Monitoramento de alimentos**. Disponível em: <http://www.vigilanciasanitaria.sc.gov.br/index.php?option=com_content&task=view&id=928&Itemid=603>. Acesso em: 19 fev 2013a.

SANTA CATARINA. Secretaria de Estado da Saúde. Diretoria de Vigilância Sanitária. **Programa de Proteção Jurídico-Sanitária dos Consumidores de Produtos de Origem Animal**. Disponível em: http://www.vigilanciasanitaria.sc.gov.br/index.php?option=com_content&task=view&id=929&Itemid=604. Acesso em: 22 fev. 2013b.

SANTA CATARINA. Secretaria de Estado da Saúde. DIVE- Diretoria de Vigilância epidemiológica. **Protocolo Estadual de Vigilância e Manejo Clínico de Brucelose Humana**. Florianópolis, 2012.

SANTA CATARINA. Lei Complementar Nº 204 de 08 de Janeiro de 2001. **Cria o Fundo Estadual de Sanidade Animal e adota outras providências**. Florianópolis, 2011. Disponível em: <http://www.google.com.br/#bav=on.2,or.r_qf.&fp=acbe00cda996269&q=Lei+Complementar+N%C2%BA+204+de+08+de+Janeiro+de+2001> . Acesso em: 23 agos. 2012.

SANTA CATARINA. Secretaria de Estado da Agricultura e da Pesca. **Portaria SAR Nº 17 de 20 de julho de 2012. Cria o Programa**

de Erradicação da Brucelose Bovina e Bubalina no Estado de Santa Catarina. Diário Oficial do Estado de Santa Catarina, Florianópolis, 24 julho 2012. Disponível em: <<http://www.doe.sea.sc.gov.br/Repositorio/20120724/Materias/54918/54918.html>>. Acesso em 30 julho 2012.

SIKUSAWA, S. et al. Situação epidemiológica da brucelose bovina no estado de Santa Catarina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte: V. 61, supl. 1, p.103-108, 2009.

SOLA, M.C. **Emprego da técnica de PCR em Tempo Real na detecção de DNA de Brucella spp em lesões de carcaças e vísceras provenientes de matadouros-frigoríficos sob Inspeção Federal**. Orientado por Albenones José de Mesquita. Goiânia, 2011. 96f. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia. Goiânia, 2011.

TRONCO, V. M. **Manual para Inspeção da Qualidade do Leite**. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria – UFSM. 166p. 2008.

YOUNG, E.J. An overview of human brucellosis. **Clinical Infectious disease**. V.21, p. 283-289, agos. 1995.

ZAFFARI,C.B; MELLO, J.F; COSTA, M. Qualidade bacteriológica de queijos artesanais comercializados em estradas do litoral norte do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.37, n.3, p.862-867, mai-jun. 2007.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Corbel M J (Org.). **Brucellosis in humans and animals**. Geneva: World Health Organization, 2006. 102 p.

3. CAPÍTULO 2

DETECÇÃO DE *Brucella abortus* EM PRODUTOS LÁCTEOS PRODUZIDOS EM SANTA CATARINA PELA TÉCNICA DE REACÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL

RESUMO

Brucelose é uma enfermidade infecto contagiosa de carácter zoonótico que está amplamente distribuída em diversos países do mundo podendo ser transmitida ao homem através do consumo de produtos de origem animal, especialmente leite e derivados. No Brasil a doença apresenta-se de forma endêmica no rebanho bovino, causando prejuízos econômicos e representando um risco para a saúde pública. Santa Catarina tem a menor prevalência de brucelose bovina do país e busca a erradicação para tornar o Estado livre da doença. A técnica de Reacção em Cadeia da Polimerase em Tempo Real foi empregada na detecção do DNA da bactéria *Brucella abortus* em 106 amostras de produtos lácteos produzidos exclusivamente em Santa Catarina. As amostras foram coletadas no comércio e na indústria no período de abril a setembro de 2012. As análises revelaram a presença de material genético de *B. abortus* em duas amostras de queijo e em seis amostras de leite cru. A técnica mostrou-se sensível e específica e possibilitou associar à rastreabilidade, o monitoramento de toda a cadeia produtiva e avaliação da qualidade do leite e derivados. A integração e cooperação entre os serviços de fiscalização, inspeção, pesquisa e defesa animal foram fundamentais para a realização deste trabalho.

Palavras chave: Zoonoses, queijo, leite cru, patógenos.

ABSTRACT

DETECTION OF *Brucella abortus* BY REAL-TIME POLYMERASE CHAIN REACTION IN DAIRY PRODUCTS IN SANTA CATARINA

Brucellosis is a zoonotic disease which is widely distributed in many countries and can be transmitted to humans through the consumption of

animal products, especially milk and dairy products. In Brazil, the disease is endemic in cattle, causing economic losses and representing a risk to public health. Santa Catarina shows the lowest prevalence of bovine brucellosis in the country and seeks the eradication in order to become the State free from the disease. The technique of Real-Time Polymerase Chain Reaction was used to detect the DNA of *Brucella abortus* bacterium in 106 samples of dairy products produced exclusively in Santa Catarina. The samples were collected from the market and industry during the period of April to September 2012. Analysis revealed the presence of genetic material from *B. abortus* in two samples of cheese and six of raw milk. The technique showed itself sensitive and specific. Furthermore, in association with traceability, it enabled the monitoring of the entire production chain and quality evaluation of milk and dairy products. The integration and cooperation between the services of inspection, research and animal defense were essential to this work.

Keywords: Zoonoses, raw milk, cheese, pathogens.

INTRODUÇÃO

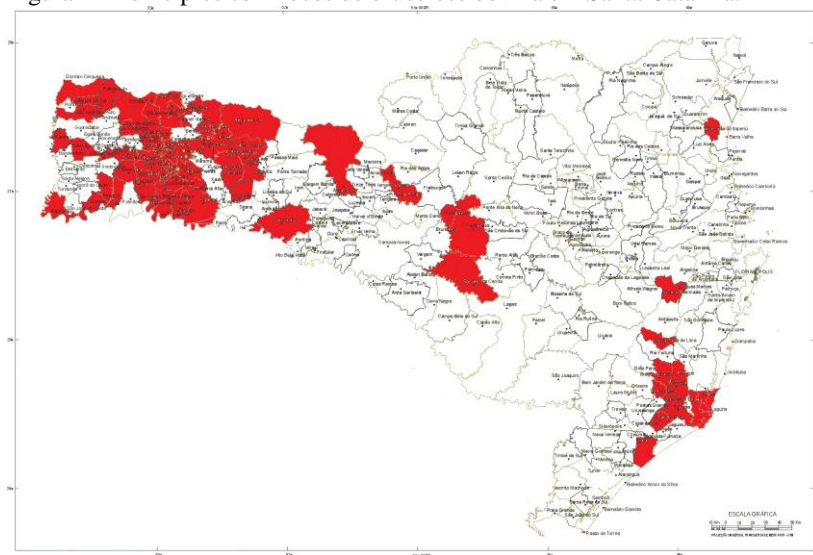
Doenças veiculadas por alimentos são causas de morbidade considerável nas populações em várias partes do mundo, tendo um grande impacto, principalmente entre crianças e idosos. Brucelose é uma zoonose que pode ser transmitida ao homem pelo consumo de produtos de origem animal ou pelo contato direto com os animais doentes ou seus produtos (WHO, 2006). Tem como agente etiológico a bactéria do gênero *Brucella* sendo quatro as espécies de interesse para a saúde pública: *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* e *B. canis* (PESSEGUEIRO, 2003).

O Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT) foi instituído em 2001 pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) com o objetivo de diminuir o impacto negativo dessas zoonoses na saúde humana e animal, além de promover a competitividade da pecuária nacional. O programa introduziu a vacinação obrigatória nos bovinos e bubalinos em todo o território nacional e definiu uma estratégia de certificação de propriedades livres ou monitoradas (BRASIL, 2006). O Estado de Santa Catarina nunca teve a vacinação como ação obrigatória, tendo prevalência de animais soropositivos para brucelose de 0,06%.

Acredita-se que o baixo índice seja consequência da pequena movimentação de animais entre as propriedades e da realização de testes diagnósticos com subsequente sacrifício dos positivos, quando ocorrem (SIKUSAWA et al.,2009).

Devido aos riscos de transmissão da brucelose aos seres humanos e aos potenciais prejuízos econômicos a Secretaria de Agricultura do Estado de Santa Catarina instituiu, em 2012, o Programa Estadual de Erradicação da doença. O Programa preconiza, entre outras ações, a realização de inquérito soro epidemiológico, submetendo ao sacrifício sanitário compulsório os bovinos reagentes com posterior indenização aos seus proprietários (SANTA CATARINA, 2012).

Figura 1- Municípios com focos de brucelose bovina em Santa Catarina.



Fonte: CIDASC, 2012

A brucelose humana no Brasil ainda é uma doença de pouca visibilidade. Por ser um agravo de complicado diagnóstico, pouco se sabe sobre a sua real situação no país. Ressalta-se ainda a necessidade de atualização periódica dos médicos para o diagnóstico da brucelose. Muitas vezes não ocorre a suspeita clínica devido ao despreparo dos profissionais de saúde em lidar com zoonoses. A parceria entre instituições públicas e privadas, dos setores de saúde pública humana e

animal, parece ser o caminho para o controle e erradicação de zoonoses como a brucelose (CARDOSO, 2012).

No Brasil, não existem dados epidemiológicos acerca da brucelose humana e, como o país abriga a maior população comercial de bovinos do mundo, este fator é presumivelmente um risco para o aumento da prevalência da doença humana causada por *B. abortus* (PAPPAS, 2006).

Em 2012, com o objetivo de identificar e tratar os casos humanos de brucelose, a Diretoria de Vigilância Epidemiológica do Estado de Santa Catarina (DIVE) elaborou o Protocolo Estadual de Vigilância e Manejo Clínico de Brucelose Humana. Naquele ano, o Laboratório Central de Saúde Pública do Estado (LACEN/SC) diagnosticou 30 sorologias reagentes para brucelose de pessoas que tiveram vínculo epidemiológico com a doença (SANTA CATARINA, 2012).

O alimento é a principal fonte de transmissão da brucelose para a população urbana, sobretudo pela ingestão de leite e derivados não pasteurizados. O leite contaminado é particularmente perigoso por ser consumido regularmente e em grande volume. Manteiga, creme ou sorvete preparados com leite cru também representam alto risco. O processo de fabricação dos queijos pode na verdade concentrar a *Brucella* que é capaz de sobreviver por muitos meses neste tipo de produto que deveriam ser conservados em temperaturas baixas no mínimo por seis meses antes de serem oferecidos ao consumo. Em muitos países o consumo de “alimentos saudáveis ou naturais” tem se tornado popular o que inclui o consumo de leite e derivados não pasteurizados o que pode ser um risco para a saúde (WHO, 2006). A *B. abortus* é sensível à pasteurização e aos desinfetantes como cal, cloro, cresol, fenol e formol, em concentrações ideais, que devem ser utilizados na desinfecção de instalações, utensílios e a ambientes (LAGE, 2008). O leite dos animais cujo diagnóstico clínico ou resultado positivo a provas diagnósticas indiquem presença de doenças infecto-contagiosas que possam ser transmitidas ao homem não deve ser processados pelas indústrias (BRASIL, 2011)

Al-Mariri (2010) concluiu durante estudo que a PCR é altamente recomendável para identificar *Brucella* em todos os tipos de amostras de leite e aconselha esta técnica como teste de rotina em animais de fazenda.

Amoroso (2011) utilizou a técnica da PCR para detectar e quantificar *Brucella* spp. em 109 amostras de leite de búfala e o método

analítico mostrou-se altamente sensível e específico em comparação ao isolamento bacteriano.

Este trabalho teve como objetivo o emprego da técnica de PCR em Tempo Real para a detecção de DNA de *Brucella* spp em leite e derivados provenientes do estado de Santa Catarina.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

Foram analisadas 106 amostras de produtos lácteos, adquiridas no comércio e na indústria, em diferentes cidades do Estado de Santa Catarina, conforme tabela abaixo:

Tabela 1: Número e tipo de produto lácteo analisado no período de abril a setembro de 2012.

Produto	Número de amostras
Queijo	84
Manteiga	9
Leite cru	6
Creme de leite	4
Requeijão	3
Total	106

Após a coleta as amostras de derivados lácteos foram separadas em frações de aproximadamente 50 gramas, e armazenadas em frascos plásticos estéreis com tampa e mantidos refrigerados a 4 graus Celsius (°C) até a realização das análises. As amostras de leite foram coletadas em frascos estéreis de 100 ml, acondicionadas em caixa térmica com gelo seco e imediatamente remetidas ao laboratório.

Extração do DNA e PCR

O protocolo de extração empregado foi desenvolvido no Laboratório Nacional Agropecuário de Pedro Leopoldo em Minas Gerais (LANAGRO/MG/MAPA) pela Divisão Técnica de Biossegurança-DBIO/Laboratório de Biologia Molecular LBM/PL. 25 miligramas (mg) de cada amostra foi macerada e homogeneizada com 1mililitro (mL) da solução de lavagem alcalina (0,5 mol/L de Citrato de Sódio), centrifugada a 17.760g por 20 minutos a 4°C e descartado o sobrenadante. O precipitado foi ressuspendido em 1mL de Tris(hidroximetil)aminometano com Ácido Clorídrico (Tris-HCL),

centrifugado a 17.760g por 20 minutos a 4°C e descartado o sobrenadante. Novamente ressuspendeu-se o pellet em 200 mL de tampão Tris EDTA (TE) e acrescentado 60 microlitros (μL) de Lisozima e colocado em Banho-Maria a 37°C por 1 hora. Posteriormente, acrescentou-se 60 μL de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) 10% e 40μL de proteinase K, e colocado novamente em Banho-Maria a 56°C por 2 horas. Foi então adicionado a amostra 0,150mL de fenol e 0,150 mL de clorofórmio e homogeneizada no vórtex, e depois centrifugada a 2.627 g por 5 minutos a 24°C sendo o sobrenadante transferido para outro micro tubo, adicionado 0,300 mL de clorofórmio e novamente homogeneizada. Posteriormente foi novamente centrifugada a 2.627 g por 5 minutos a 24°C e o sobrenadante transferido para outro micro tubo e adicionado etanol 95% (duas vezes o volume do sobrenadante). A amostra foi refrigerada por 1 hora -80°C para precipitação do DNA e então centrifugada a 17.760g por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o tubo foi invertido por alguns instantes em papel toalha e colocado no banho seco a 40°C. O precipitado foi suspenso novamente em 0,020mL de tampão TE e armazenado em -20°C até sua utilização.

A detecção do DNA de *Brucella* spp. foi realizada a partir de dois protocolos com alvos para is6501 e is711. Ambas as reações foram padronizadas para um volume total de 25 uL contendo 12,5 uL de RealQ x2 PCR Master Mix (Ampliqon, Denmark), 0,6 μL de Cloreto de Magnésio (MgCl₂) 50milimolar (mM), 2 μL de DNA (concentração entre 300 e 600 nanograma por microlitro (ng/μL)). Os oligonucleotídeos e suas respectivas concentrações estão listados na tabela 2. As reações para os dois alvos foram realizadas sob as seguintes condições de ciclagem no equipamento ABI7500 (Life Technologies, Estados Unidos): 50°C por dois minutos, 95 °C por quinze minutos seguido de 45 ciclos a 95°C por quinze segundos e 60 °C por um minuto.

Tabela 2. Sequência de oligonucleotídeos usada na PCR em tempo real para detecção de *B. abortus* em produtos lácteos.

Oligonucleotí deo	Alvo	Sequência	Concentração (pmol/ µL)
Bru. IS6501.128.F		TGGTGTGTCAATGAGGACA	0,4
Bru. IS6501.128.R	IS650	GACCTTCGGCAAAATGGACAG	0,4
Bru. IS6501.128.S		FAM-CGGCGGTATCAGCCAGGGCAT-BHQ1	0,2
Bru. IS711.133.F		GCCCTTAAGTGATCGGCATC	0,5
Bru. IS711.133. R	IS711	GCCTACCGCTGCGAATAAAG	0,5
Bru. IS711.133.S		FAM-TGCCCCCACACCCCTTCAAGCC-BHQ1	0,3

O genoma de *Brucella* spp contém a sequência de inserção (IS) chamada de IS711 ou IS6501, que é específica para o gênero. O número de cópias e a localização genômica desta sequência difere entre as espécies, variando de 7 a 10 cópias na *B. abortus*, *B. melitensis* e *B. suis*, e mais de 30 cópias na *B. ovis* e em cepas de *B. neotomae* (HINIC et al., 2009).

Como controle positivo e negativo foi usada *Brucella abortus* extraída de meio de cultura e solução salina estéril, respectivamente. Foram consideradas positivas as amostras que amplificaram para ambos os alvos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As amostras avaliadas, conforme Tabela 3, apresentaram resultados positivos para *B. abortus*: Um queijo colonial e um queijo mussarela. O primeiro, adquirido no comércio ambulante, não apresentava rotulagem ou qualquer inscrição que indicasse a procedência inviabilizando, assim a rastreabilidade do produto. O segundo deles, comprado em supermercado, apresentava-se embalado e rotulado, permitindo assim, identificar o laticínio fabricante. Neste, foram coletadas seis amostras de leite cru refrigerado, diretamente do caminhão tanque, provenientes das propriedades rurais. Essas amostras também se revelaram positivas para *B. abortus*.

Tabela 3 Quantidade de amostras positivas e negativas encontradas.

Produto	Amostras negativas	Amostras positivas
Queijo	82	2
Manteiga	9	0
Creme de leite	4	0
Requeijão	3	0
Leite	0	6
Total	98	8

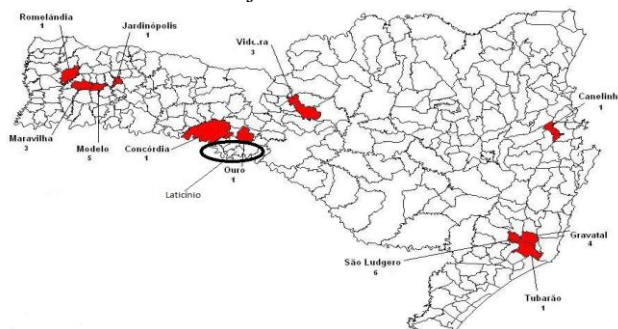
A especificidade analítica foi descrita por Bricker (2002) como sendo um método eficiente e rápido que pode ser utilizado para a detecção da *Brucella* spp. em animais infectados e alimentos. Além da alta sensibilidade, a técnica é simples, com relativo baixo custo e pouco trabalho manual. Nesse contexto, a PCR se mostra como uma forte opção para o diagnóstico da brucelose sendo uma alternativa promissora para a problemática do cultivo e identificação de *Brucella* spp. através das tecnologias convencionais (LEAL-KLEVEZAS et al. 1995). A PCR

em Tempo Real pode ser usada como teste de triagem em bovinos usando o leite como matriz. A técnica também pode ser incluída nos programas de monitoramento de leite e derivados no comércio.

O resultado desse trabalho confirma a presença do micro organismo no rebanho produtor de leite. No ano de 2012 somente em 35 (39,32%) propriedades com focos de brucelose bovina foram realizadas as investigações das pessoas que tiveram algum contato direto ou indireto e com vínculo epidemiológico com os animais infectados (SANTA CATARINA, 2012). Este dado pode presumir que é possível que existam mais pessoas reagentes que o número notificado oficialmente.

Em comparação com o resultado encontrado verificou-se que na região próxima ao laticínio produtor do queijo e leite com PCR positiva para *B. abortus* há pessoas soro reagentes para brucelose, como mostra a figura 2.

Figura 2- Pessoas com sorologia reagente para Brucelose, por município de SC, de janeiro de 2008 a julho de 2011 e laticínio pesquisado.



Fonte: LACEN /SC, 2012

Alguns municípios que apresentaram focos de brucelose bovina não apresentaram pessoas reagentes para brucelose humana e vice versa. Nem sempre é possível determinar a fonte de infecção, especialmente quando se tratar de alimento, pois este pode ser consumido fora do domicílio ou proveniente de locais diversos.

A oferta de alimentos *in natura*, principalmente leite e derivados pode representar um risco para a saúde. Portanto, o tratamento térmico no

leite deve ser implementado e monitorado em locais explorados por turismo rural e gastronômicos.

A PCR em Tempo Real detecta a presença de DNA do micro-organismo que pode ou não estar viável no alimento. Por outro lado, o leite de animais portadores de brucelose não pode ser comercializado, ou seja, estes animais não devem estar em produção. A legislação brasileira permite que alguns tipos de queijos possam ser fabricados com leite cru, mas o tempo de maturação preconizado, mínimo 60 dias, pode não ser suficiente para eliminar a bactéria. Além disso, o país importa alguns tipos de queijos fabricados com leite cru.

A rotulagem permite entre outras informações a rastreabilidade, podendo ser tomadas ações corretivas na produção primária, de modo a evitar a transmissão de zoonoses pelo alimento. Conhecendo-se a procedência torna-se possível a adoção de medidas de controle ou correção. Para tanto é imprescindível a interação e cooperação entre órgãos, instituições ou serviços para que toda a cadeia alimentar seja monitorada ou fiscalizada e as informações resultantes ofereçam subsídios para tomada de ações em prol da saúde pública. Além disso, forneceriam dados sobre a situação epidemiológica permitindo assim a detecção de focos, a investigação de casos humanos, a interdição de produtos contaminados no comércio e a orientação ao consumidor.

A população deve ser esclarecida para que consuma somente produtos de origem animal inspecionados, para que tenha garantias de qualidade, sanidade e rastreabilidade. A indústria tem o dever de oferecer produtos seguros e de zelar pela saúde dos consumidores que, por sua vez, não se eximem da responsabilidade de seguir as orientações descritas nos rótulos dos produtos, especialmente aquelas referentes à conservação e prazo de validade.

CONCLUSÕES

As amostras submetidas à técnica de PCR não exigiram procedimentos ou condições especiais durante a coleta, transporte ou armazenamento.

Para a amostra de queijo contaminado com *B. abortus*, oriunda de produto rotulado, foi possível identificar o fabricante e avaliar a matéria prima (leite) usado na sua fabricação. Entretanto, para a segunda amostra positiva de queijo, não foi possível identificar o fabricante, pois se tratava de produto não inspecionado e sem rótulo.

Apesar do Estado de Santa Catarina estar em processo de erradicação da doença ainda há pessoas e bovinos com brucelose.

Não foi possível relacionar os casos humanos com os bovinos infectados.

A interação das ações e a troca de informações entre os serviços de pesquisa, defesa sanitária, inspeção e vigilância epidemiológica são fundamentais para o monitoramento da qualidade dos alimentos e para a tomada das ações corretivas em toda a cadeia produtiva de produtos de origem animal visando impedir a transmissão de zoonoses.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Al-Mariri, A; Haj-Mahmoud, N. **Detection of Brucella abortus in Bovine Milk by Polymerase Chain Reaction. ACTA VET. BRNO**, v.79 p. 277-280, doi:10.2754/avb201079020277, 2010. Disponível em: <<http://www.actavet.vfu.cz/pdf/201079020277.pdf>>. Acesso em: 06 de janeiro de 2013.

AMOROSO, M.G. et al. 2011. Validation of a Real-time PCR assay for fast and sensitive quantification of Brucella spp. in water buffalo milk. **Food Control**, v. 22, p.1466–1470, agosto 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713511000867>>. Acesso em: 13 de janeiro de 2013.

LEAL-KLEVEZAS, D.S, et al. Single-step PCR for detection of Brucella spp. from blood and milk of infected animals. **J Clin Microbiol**, v.33, p.3087-3090, 1995.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT)**. Brasília: 2006. 184p. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Aniamal/programa%20nacional%20sanidade%20brucelose/Manual%20do%20PNCEBT%20-%20Original.pdf>. Acesso em: 12 de junho de 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011**. Aprova o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite

Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, 30 dez. 2011. Seção 1, p. 6. Disponível em: <<http://www.in.gov.br/visualiza/index.jsp?data=30/12/2011&jornal=1&pagina=6&totalArquivos=160>>. Acesso em: 23 agosto 2012.

BRICKER, B. J. PCR as a diagnostic tool for brucellosis. **Vet. Microbiol**, v.90, p.435-446, 2002.

CARDOSO, S; COSTA, L. **A brucelose no Brasil sob o enfoque da saúde pública.** Disponível em: <[http://www.cpgls.ucg.br/7mostra/Artigos/SAUDE%20E%20BIOLOGI CAS/A%20BRUCELOSE%20NO%20BRASIL%20SOB%20O%20ENFOQUE%20DA%20SA%20C3%9ADE%20P%20C3%9ABLICA-TCC-revista%20PUC\[1\].pdf](http://www.cpgls.ucg.br/7mostra/Artigos/SAUDE%20E%20BIOLOGI CAS/A%20BRUCELOSE%20NO%20BRASIL%20SOB%20O%20ENFOQUE%20DA%20SA%20C3%9ADE%20P%20C3%9ABLICA-TCC-revista%20PUC[1].pdf)>. Acesso em: 13 maio 2012.

HINIC, V.; BRODARD, I.; THOMANN, A.; HOLUB, M.; MISEREZ, R.; ABRIL, C. IS711-based real-time PCR assay as a tool for detection of *Brucella* spp in wild boars and comparison with bacterial isolation and serology. **BMC Veterinary Research**, London, [online], v. 5, n. 22, 2009. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/1746-6148/5/22>. Acesso em: 2 jul. 2012.

LAGE, A. et al. Brucelose bovina: uma atualização. **Rev Bras Reprod Anim.**, Belo Horizonte, v.32, n.3, p.202-212, jul./set. 2008.

PAPPAS, G. *et al.* The new global map of human brucellosis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 6, i. 2, p. 91-99, fev. 2006. Disponível em: <[http://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS14733099\(06\)70382-6/fulltext](http://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS14733099(06)70382-6/fulltext)>. Acesso em: 10 de junho de 2012.

PESSEGUEIRO, P; BARATA, C; CORREIA, J. **Brucelose, uma revisão sistematizada.** Medicina Interna, V. 10, n. 2, P. 91-96, 2003.

POESTER, F. et al. Estudos de prevalência da brucelose bovina no âmbito do Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose: Introdução. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 61, supl. 1, p.1-5, 2009.

SANTA CATARINA. Secretaria de Estado da Saúde. Diretoria de Vigilância epidemiológica. **Protocolo Estadual de Vigilância e Manejo Clínico de Brucelose Humana**. Florianópolis, 2012.

SANTA CATARINA. Secretaria de Estado da Agricultura e da Pesca. **Portaria SAR Nº 17 de 20 de julho de 2012. Cria o Programa de Erradicação da Brucelose Bovina e Bubalina no Estado de Santa Catarina. Diário Oficial do Estado de Santa Catarina**, Florianópolis, 24 julho 2012. Disponível em:
<<http://www.doe.sea.sc.gov.br/Repositorio/20120724/Materias/54918/54918.html>>. Acesso em 30 de julho 2012.

SANTA CATARINA. Companhia Integrada de Desenvolvimento Agrícola de Santa Catarina- CIDASC. **Informes Epidemiológicos**. Florianópolis, 2012. Disponível em:
<<http://www.cidasc.sc.gov.br/defesasanimais/informes-epidemiologicos/>>. Acesso em 20 de setembro de 2013.

SIKUSAWA, S. et al. Situação epidemiológica da brucelose bovina no estado de Santa Catarina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, V. 61, supl. 1, p.103-108, 2009.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Corbel M. J. (Org.). **Brucellosis in humans and animals**. Geneva: World Health Organization, 2006. 102p.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ao término desse estudo foi possível evidenciar que a brucelose é uma doença que ainda persiste no Estado, tanto em humanos quanto nos animais.

A pasteurização do leite elimina o risco dos humanos contraírem a doença. Por esse motivo o consumo de leite cru não deve ser recomendado, especialmente nas atividades de turismo rural.

Apesar da PCR detectar o DNA da bactéria não significa que esta se encontre viável, mas o fato de estar presente no leite indica que animais doentes estão em produção, contrariando as normas sanitárias.

A detecção molecular de *B. abortus* apresenta-se vantajosa em relação a outras técnicas convencionais em razão da rapidez na execução das análises, alta sensibilidade e especificidade e não exige condições especiais durante o transporte das amostras. Permite também o diagnóstico em amostras deterioradas ou até mesmo contaminadas.

Os serviços básicos de saúde devem estar atentos aos sinais e sintomas da doença nos humanos atuando em conjunto com a vigilância epidemiológica para diagnosticar precocemente a doença e evitar novos casos. Da mesma forma a defesa sanitária animal deve participar da troca de informações com os serviços de saúde para detectar focos de brucelose no rebanho.